N° d'enregistrement au C.N.R.S.

A.O.11 858

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant * - en partie *

la THESE présentée

en vue de l'obtention

du grade de DOCTEUR ès SCIENCES

à l'Université Pierre et Marie Curie

- Paris 6 -

par Melle LUCAS Marguerite

Sujet de la thèse : Mécanisme d'action des phénols iodés et de l'acide glyoxylique sur les phosphorylations oxydatives de mitochondries isolées

soutenue le 24 Juin 1975

devant le jury composé de :

Mr DER GARABEDIAN

Mr MICHEL

Mme CHAIX

Melle GAUTHERON

Mr BUVET

M

* Rayer la mention inutile.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

N° d'enregistrement au C.N.R.S.
A.0.11 858

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant * - en partie *

la THESE présentée

en vue de l'obtention

du grade de DOCTEUR ès SCIENCES

à l'Université Pierre et Marie Curie
- Paris 6 -

par Melle LUCAS Marguerite

Sujet de la thèse : Mécanisme d'action des phénols iodés et de l'acide glyoxylique sur les phosphorylations oxydatives de mitochondries isolées

soutenue le 24 Juin 1975

devant le jury composé de :

Mr DER GARABEDIAN

Mr MICHEL

Mme CHAIX

Melle GAUTHERON

Mr BUVET

M

UNIV. LEIDEN BIBL.

* Rayer la mention inutile.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548106_0013

BIOCHIMIE, 1975, 57, 637-645.

Influence de l'acide glyoxylique sur les propriétés des mitochondries isolées.

Marguerite Lucas (*◇) et Anne-Marie Pons (**).

Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Collège de France, Place Marcelin Berthelot, 75231 Paris Cedex 05, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris-Luxembourg — 75270 Paris Cedex 06.

(7-10-1974).

Summary. — Glyoxalate is an effector of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria : it slows down State 3 but does not affect State 4 respiration. This report presents the findings of our study on the mechanism of action of glyoxalate ; these findings are listed below.

The inhibition of Stage 3 respiration by glyoxalate does not set in immediately, can be reversed in part by the addition of an uncoupling agent or a dithiol, is non-competitive against succinate and can be demonstrated with substrates requiring the involvment of other membrane transport systems.

Glyoxalate prevents the increased oxygen uptake stimulated by 2,4-DNP or Sr^{++}. Glyoxalate also inhibits phosphate transport and this inhibition can account for most of the effects observed.

The inhibition of State 3 respiration is paralleled by a decrease in the mitochondrial accumulation of succinate : this decrease could arise from a direct effect of glyoxalate on dicarboxylic acid transport or could be the result of an inhibition of the phosphate transport system, which is connected with the former.

The decrease in the respiratory rate of uncoupled mitochondria placed in a phosphate free medium demonstrates that the effector acts directly at the substrate transport or/and electron transfer level. Phosphate, by delaying the respiratory inhibition due to glyoxalate, has a protecting effect on mitochondrial functions.

Glyoxalate is thus acting at several mitochondrial sites. It acts presumably by forming hemimercaptals, blocking sulfhydryl groups. Its effects can be accounted for by the unfolding of such (hemicercaptal) groups under the influence of ADP, Pi, uncoupling or others agents which bring about conformational changes in the internal mitochondrial membrane.

INTRODUCTION.

L'acide glyoxylique ou acide oxoéthanoïque est un constituant de plusieurs microorganismes [1] que l'on a caractérisé également chez l'animal en état d'avitaminose B_1 ou d'oxalose [2]. Le glyoxylate diminue l'activité de plusieurs enzymes du cycle de Krebs telle que l'α-cétoglutarate deshydrogénase [3] ; par ses produits de condensation avec l'oxaloacétate ou le pyruvate, respectivement l'oxalomalate et le 3-hydroxy-2-cétoglutarate, il provoque l'inhibition réversible de l'isocitrate deshydrogénase et de l'aconitate hydratase [4]. Il contrôlerait ainsi, directement ou indirectement, la vitesse du cycle citrique dans les mitochondries hépatiques de rat [5]. Le glyoxylate affecte aussi les oxydophosphorylations des mitochondries isolées puisqu'il freine leur respiration lorsqu'elles sont placées dans les états actif ou découplé mais il ne modifie pas celle de l'état contrôlé [6].

La fonction aldéhyde du glyoxylate le rend très réactif vis-à-vis des groupements thiols avec lesquels il peut former des hémimercaptals [5]. De nombreux travaux mettent en évidence l'intervention de ces groupements dans la plupart des fonctions mitochondriales : systèmes de transport membranaires, couplage, chaîne de transfert des électrons ; en effet l'activité de ces systèmes enzymatiques est influencée par divers agents alkylants telle la N-éthyl maléimide (NEM) [7-10], c'est

(*) Ce travail fait partie d'une thèse de doctorat d'état en Sciences qui doit être soutenue à l'université de Paris VI.

(**) Avec la collaboration de Mme J. Roman et grâce à une subvention du C.N.R.S.

*◇ A qui toute correspondance doit être envoyée au Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Collège de France, 75231 Paris Cedex 05.

pourquoi nous avons suivi l'effet du glyoxylate sur la consommation d'oxygène des mitochondries en présence de substrats faisant intervenir des transporteurs d'anions différents [11-15] et dans divers états énergétiques. Nous rechercherons également s'il modifie l'acivité du transporteur de phosphate [16, 17] et des dicarboxylates, une inhibition à ce niveau pouvant rendre compte de la diminution de la vitesse respiratoire [18, 19].

Nos résultats correspondent à une accessibilité des thiols, variable suivant l'état énergétique, et peuvent être rapprochés des données antérieures obtenues avec d'autres réactifs [8, 20, 21].

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

1. *Préparation des mitochondries.*

Les mitochondries hépatiques de rat sont préparées et conservées dans du saccharose 0,25 M à 0°C selon la méthode de Schneider et Hogeboom [22] partiellement modifiée [23]. La concentration en protéines est déterminée par une méthode rapide au biuret [24].

2. *Mesure de la consommation d'oxygène.*

Les vitesses respiratoires sont mesurées par polarographie à l'aide d'une électrode vibrante recouverte d'une membrane de téflon reliée à un enregistreur Gilson GME. Les essais sont réalisés à 25°C dans une cellule thermostatée de 1 ml ou 1,5 ml. Les mitochondries sont mises en suspension dans du tampon de Chance pH 7,35 de composition suivante : NaF 12 mM, $MgCl_2$ 6 mM, KH_2PO_4 3 mM, NaCl 26 mM, K_2HPO_4 13 mM. Lorsque le substrat utilisé est du succinate de sodium, on ajoute de la roténone 1,5 µM afin de bloquer la NADH deshydrogénase.

3. *Mesure du transport de phosphate.*

Lorsque les mitochondries sont mises en suspension dans du phosphate d'ammonium isotonique, on peut considérer que la fixation d'eau qui se traduit par une variation de la densité optique est fonction de l'activité du transporteur de phosphate [25]. Nous avons abordé cette étude en mettant en œuvre la technique de Chappell et Crofts [25] modifiée par Debise et Durand [26]. Les mitochondries sont préincubées dans du tampon saccharose 250 mM, Tris 40 mM, EGTA 1 mM pH 7,4 à 25°C (8 mg de protéines mitochondriales par ml). On ajoute l'effecteur et au bout d'une minute la réaction est arrêtée par dilution : 0,2 ml de l'incubat sont ajoutés dans une cuve optiquement taillée contenant 2,8 ml de phosphate d'ammonium 100 mM. On utilise un spectrophotomètre Gilford relié à un enregistreur. La densité optique est mesurée à 546 nm.

4. *Mesure du transport du succinate.*

Les mesures sont réalisées grâce à une technique de centrifugation-filtration mise au point par Werkheiser et Bartley [27] adaptée par Harris et Van Dam [28]. Cette technique permet de séparer très rapidement les mitochondries de leur milieu de suspension sans modifier leur contenu ou leur perméabilité. Le milieu d'incubation est le même que celui utilisé pour les mesures oxygraphiques, mais on ajoute de l'antimycine A (0,6 µg/ml) qui bloque le transfert des électrons afin d'empêcher l'oxydation du succinate et la fuite des produits de dégradation. L'accumulation du succinate n'est pas influencée par l'addition d'antimycine A [29]. Lors des déterminations de concentrations intramitochondriales du substrat, on introduit dans le milieu (1,5 ml) 0,4 µCi de ^{14}C succinate (activité spécifique : 27 mCi par nmole) et 1,5 µCi d'eau tritiée).

Des essais parallèles réalisés avec de l'eau tritiée et du dextrane marqué au ^{14}C permettent de déterminer le volume mitochondrial par rapport au volume total entraîné dans le culot acide. La réaction est déclenchée par addition des particules (7 mg de protéines mitochondriales par ml) et, après une incubation de 60 secondes, une partie de la suspension est prélevée et déposée dans un microtube à centrifuger contenant une couche d'acide perchlorique 1,6 N de densité 1,09, surmontée d'une couche d'huile siliconée de densité bien définie 1,06 qui permet le passage des particules et d'une faible partie du milieu d'incubation. En parvenant dans la couche acide, les mitochondries sont lysées et libèrent leur contenu. Des parties aliquotes du milieu, du surnageant et de l'extrait acide sont prélevées et leur radioactivité mesurée au compteur à scintillation Tricarb Packard. Les calculs et les tests statistiques sont faits à l'aide d'une Programma 101 (*).

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS.

A. — Influence du glyoxylate sur la respiration des mitochondries isolées.

1. *Respiration en état 3 en présence de succinate.*

a) *Concentration variables en effecteur.*

Les enregistrements présentés sur la figure 1a montrent que lorsque le glyoxylate est ajouté en état 4, il ne modifie pas la vitesse de consommation d'oxygène des mitochondries. Lorsque l'on ajoute ensuite de l'ADP, on observe une stimulation tran-

(*) Nous remercions M. Jean Maccario pour l'analyse mathématique des résultats.

sitoire de la respiration qui diminue progressivement jusqu'à obtention d'une vitesse constante. Celle-ci varie avec la concentration en glyoxylate et peut être inférieure à celle de l'état 4. Ce fait est à souligner puisque la figure 1 montre que l'état 4 n'est jamais modifié quelque soit la concentration d'effecteur utilisée.

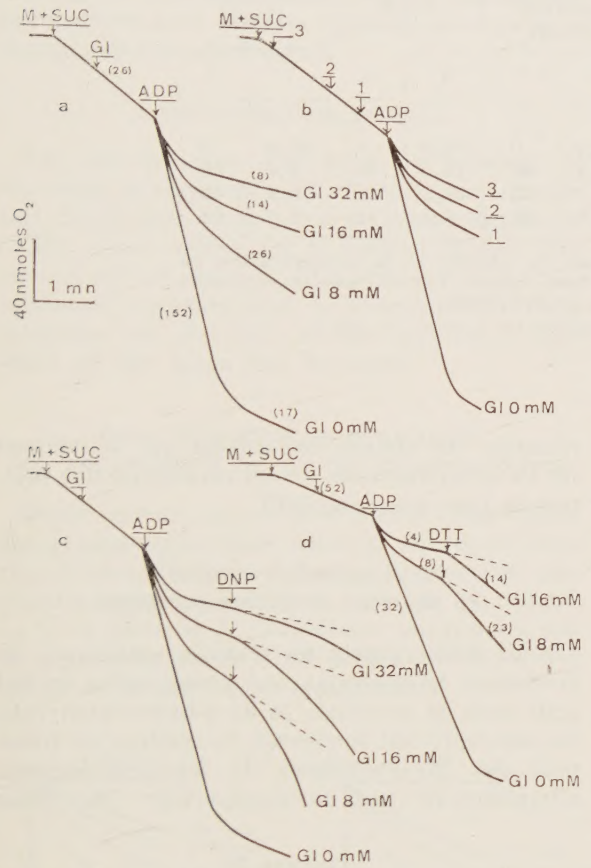

FIG. 1. — *Influence du glyoxylate (Gl) sur la respiration des mitonchondries.*

Les mitochondries sont en suspension dans 1,5 ml de tampon de Chance pH 7,4 à 25°C contenant de la roténone 1,5 µM et du succinate 6 mM (SUC). Les chiffres entre parenthèses indiquent les vitessses respiratoires en nmoles d'O_2 consommées par minute et par mg de protéines.

M = mitochondries ADP = 0,5 mM.

(a) *Concentrations variables de glyoxylate.*

Protéines mitochondriales = 1,2 mg/ml.

(b) *Incubation du glyoxylate en état 4 pendant des temps variables.*

Les chiffres soulignés indiquent l'addition de glyoxylate 16 mM.

1 = 30 sec *2* = 1 mn *3* = 2 mn.

Les temps d'incubation sont calculés à partir de l'addition du glyoxylate jusqu'à l'addition d'ADP.

Protéines mitochondriales = 1,4 mg/ml.

(c) *Influence du 2,4 dinitrophénol (DNP) sur l'inhibition respiratoire en état 3 produite par le glyoxylate.*

Protéines mitochondriales = 1,2 mg/ml.

DNP = 50 µM.

= témoins sans DNP.

(d) *Influence du dithiothreitol (DTT) sur l'inhibition respiratoire en état 3 produite par le glyoxylate.*

Protéines mitochondriales = 1,1 mg/ml.

DTT = 10 mM.

---------- = témoins sans DTT.

b) *Temps d'incubation.*

Dans ces essais nous avons ajouté l'ADP après des temps d'incubation variables du glyoxylate en état 4 : 30 secondes, 1 minute et 2 minutes. On observe sur la figure 1b que l'intensité et la durée de la stimulation respiratoire provoquées par le nucléotide décroissent lorsque le temps d'incubation augmente.

c) *Influence de l'addition d'un découplant sur l'inhibition.*

Nous voyons sur la figure 1c que l'addition de 2,4-dinitrophénol (DNP) à une suspension mitochondriale dont la respiration en état 3 est inhibée par le glyoxylate provoque une accélération de celle-ci ; en présence d'un découplant l'inhibition est donc partiellement réversible. Les caractéristiques de la levée d'inhibition sont les suivantes :

i) elle n'est pas immédiate : la respiration s'accélère progressivement après l'addition du DNP.

ii) elle est partielle : on ne rétablit jamais la vitesse respiratoire du témoin sans glyoxylate.

d) *Influence d'un dithiol sur l'inhibition.*

Le dithiothréitol (DTT) est un dithiol qui lève ou prévient les inhibitions dues au blocage des thiols [7]. Nous avons suivi l'influence de ce réactif sur l'inhibition que produit le glyoxylate en état 3. Comme le montre la figure 1d, son addi-

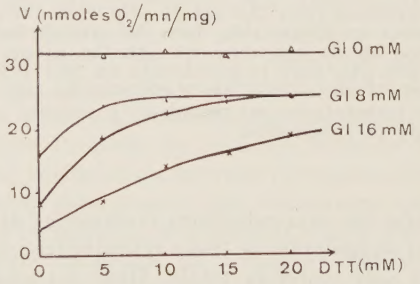

FIG. 2. — *Action du dithiothreitol (DTT) sur l'inhibition respiratoire du glyoxylate en état actif.*

Les mitochondries (2,3 mg de protéines dans 1,5 ml) sont en suspension dans du tampon de Chance pH 7,4 à 25°C contenant de la roténone 1,5 µM. Le substrat est du succinate de sodium 6 mM. Le glyoxylate (Gl) est ajouté 1 mn avant l'ADP 0,5 mM, le DTT est ajouté 80 secondes après l'ADP, lorsque l'inhibition est établie.

△ = témoin sans glyoxylate.
• = glyoxylate 4 mM.
+ = glyoxylate 8 mM.
× = glyoxylate 16 mM.

TABLEAU I.

Influence du glyoxylate sur la respiration de mitochondries placées en état 3 en présence de divers substrats.

Glyoxylate	Glutamate 3 mM + Malate 6,7 mM		Malate 10 mM + Isocitrate 10 mM		Succinate 6 mM		β-Hydroxybutyrate 12 mM	
	V	I	V	I	V	I	V	I
0 mM	81,8	0	37,2	0	76,8	0	20,4	0
8 mM	22,4	73	19,1	49	15,0	81	8,4	59
12 mM	14,4	82	14,1	62	10,2	87	6,6	68
16 mM	10,4	87	12,0	68	7,2	91	6,6	68

Les essais sont réalisés dans du tampon de Chance et la concentration en protéines mitochondriales est de 1,4 mg dans 1,5 ml. Les vitesses respiratoires sont mesurées une minute après addition de l'effecteur.

V = vitesse respiratoire exprimée en nmoles O_2 × mn^{-1} × mg^{-1}.
I = inhibition exprimée en pour cent.

tion provoque une stimulation de la consommation d'oxygène. Celle-ci est immédiate, contrairement à ce que l'on observe après l'addition d'un découplant. Les résultats présentés sur la figure 2 montrent que des concentrations croissantes de dithiothréitol augmentent la levée d'inhibition, sans que celle-ci soit toutefois totale. Dans les conditions expérimentales choisies, 27 p. cent de la respiration en état 3 reste bloquée.

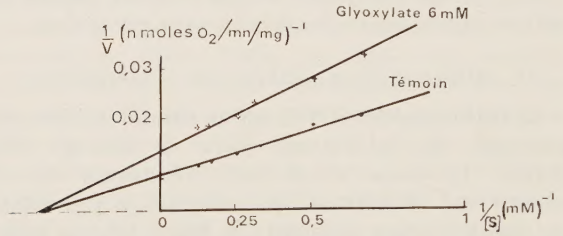

FIG. 3. — *Cinétique d'inhibition par le glyoxylate de la respiration de mitochondries placées en état actif en présence de succinate.*

Les mitochondries (2,3 mg de protéines dans 1,5 ml) sont mises en suspension dans du tampon de Chance contenant de la roténone 1,5 µM. On ajoute ensuite l'ADP 250 µM, puis le glyoxylate ou son solvant. La réaction est déclenchée par l'addition du substrat. La vitesse respiratoire est mesurée 1 minute après le début de la respiration.

e) *Nature de l'inhibition.*

La figure 3, représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk, rend compte des résultats obtenus avec des concentrations variables de succinate. La vitesse respiratoire est mesurée une minute après addition du substrat qui déclenche la réaction. On obtient des droites qui se coupent sur l'axe des abscisses, ce qui caractérise une inhibition de type non compétitif.

2. *Respiration en état 3 en présence de divers substrats.*

Nous avons repris les travaux antérieurs sur l'influence du glyoxylate sur la respiration en état actif avec du succinate et du β-hydroxybutyrate. Le succinate fait intervenir le système de transport des dicarboxylates, le β-hydroxybutyrate n'impliquerait pas de transporteur [30]. Nous

TABLEAU II.

Influence du glyoxylate sur la respiration de mitochondries placées dans divers états énergétiques.

Glyoxylate	Activateurs respiratoires					
	ADP 530 µM		Sr++ 600 µM		DNP 50 µM	
	V	I	V	I	V	I
0 mM	76,8	0	110,3	0	53,9	0
8 mM	15,0	80,5	39,8	64	38,3	29
16 mM	7,2	90,6	19,5	83	33,9	37

Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte. Les vitesses respiratoires sont mesurées une minute après addition du glyoxylate. La concentration en protéines mitochondriales est de 1,4 mg dans 1,5 ml.

V = vitesse respiratoire exprimée en nmoles O_2 × mn^{-1} × mg^{-1}.
I = inhibition exprimée en pour cent.
Le substrat est du succinate de sodium 6 mM.

avons suivi également son comportement avec les mélanges glutamate-malate et malate-isocitrate, le premier met en jeu les transporteurs des dicarboxylates et des acides aminés, le deuxième ceux des dicarboxylates et tricarboxylates [30]. Les résultats du tableau I montrent que l'inhibition se manifeste avec tous ces substrats et croît avec la concentration d'effecteur.

3. *Divers états énergétiques.*

Les mitochondries sont mises en présence de succinate, la respiration est stimulée par addition soit d'ADP, soit de Sr^{++}, soit de 2,4-dinitrophénol (DNP). Nous voyons sur le tableau II que dans chacun de ces états, le glyoxylate provoque une inhibition croissant avec sa concentration. Cette inhibition est plus forte en état actif ou en présence de Sr^{++} qu'en état découplé.

B. — Influence du glyoxylate sur les systèmes de transport membranaire.

Divers auteurs ont mis en évidence l'importance des groupements thiols dans les fonctions mitochondriales, ils participent en particulier aux translocations notamment à celle du phosphate. La levée partielle de l'inhibition respiratoire due au glyoxylate par le dithiothréitol confirme une action au niveau de ces groupements.

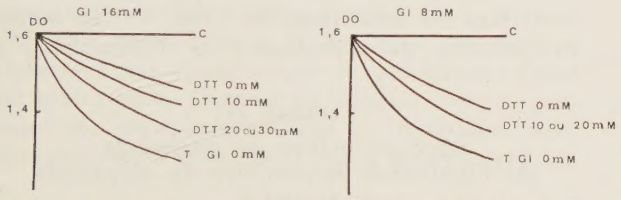

Fig. 4. — *Influence du glyoxylate sur l'activité du transporteur de phosphate.*

Les mitochondries (4 mg de protéines) sont préincubées à 25°C dans 0,5 ml de tampon saccharose 250 mM tris 40 mM EGTA 1 mM pH 7,4. Après 1 minute 0,2 ml de cet incubat sont ajoutés dans la cuve du spectrophotomètre à 2,8 ml de phosphate d'ammonium 100 mM pH 7,4 et la variation de la densité optique (D.O.) est suivie à 546 nm.

Lors des études de levée d'inhibition, le dithiothreitol (DTT) est ajouté dans l'incubat à la fin de la préincubation, une minute après le glyoxylate.

Afin de vérifier que les effecteurs ne provoquent pas par eux-mêmes de gonflement des mitochondries, des contrôles (C) sont effectués en ajoutant ces produits dans un milieu ne contenant pas de phosphate : le milieu d'incubation.

T = témoin sans glyoxylate.

1. *Transporteur de phosphate.*

Les mitochondries mises en suspension dans du phosphate d'ammonium fixent rapidement de l'eau ce qui provoque une diminution de la densité optique (D.O.). Les variations de la D.O. traduisent l'activité du transporteur de phosphate. Afin de vérifier que le glyoxylate ne provoque pas par lui-même des modifications du volume des mitochondries, nous avons réalisé des contrôles (C) (fig. 4) en ajoutant l'effecteur dans le milieu d'incubation ne contenant pas de phosphate : la densité optique n'est pas modifiée. Les enregistrements rapportés sur la figure 4 montrent que le glyoxylate 8 et 16 mM incubé pendant une minute avec des mitochondries entraîne une inhibition nette de l'entrée du phosphate. En présence de glyoxylate 8 et 16 mM, le dithiothréitol provoque une levée d'inhibition maximale pour des concentrations respectives de 10 et 20 mM. Dans les deux cas 37 p. cent de l'activité du transporteur reste bloquée.

A propos de ces résultats une remarque s'impose : le milieu dans lequel on suit le gonflement contient une certaine quantité de glyoxylate libre apporté par le milieu d'incubation. Dans le phosphate d'ammonium la concentration en effecteur est toutefois 15 fois plus faible que dans le milieu d'incubation. Nous avons voulu connaître l'influence de cet apport d'effecteur sur le gonflement. Dans ce but nous avons réalisé des essais en préincubant les mitochondries sans glyoxylate et en rajoutant celui-ci dans le phosphate d'ammonium à des concentrations 15 fois plus faibles que celles utilisées lors des préincubations ; dans ces conditions les enregistrements sont identiques à ceux du témoin T réalisé sans effecteur.

Le phosphate peut être échangé à travers la membrane mitochondriale par l'intermédiaire de deux transporteurs : l'un qui réalise un échange phosphate/hydroxyle, l'autre phosphate/dicarboxylate [31]. Dans les conditions expérimentales choisies, il est vraisemblable que l'on mesure principalement l'activité du premier. Nous avons tout de même vérifié si un échange phosphate/dicarboxylate avait lieu. Dans ce but, nous avons ajouté au milieu d'incubation du phénylsuccinate qui est un inhibiteur compétitif du transport des dicarboxylates [32]. Aux concentrations d'inhibiteur utilisées, 10 et 20 mM et étant donné la faible quantité de dicarboxylates (substrats endogènes), l'activité du transporteur doit être totalement inhibée. Lorsque les particules sont incubées pendant une minute avec le phénylsuccinate, les variations de la D.O. en présence de phosphate d'ammonium sont semblables à celles du témoin T. La technique utilisée permet donc bien de mesurer seulement l'activité du transporteur Pi/OH^-.

2. *Accumulation intramitochondriale du succinate.*

Nous avons suivi la concentration intramitochondriale du succinate afin de déterminer si l'effet inhibiteur respiratoire en état 3 du glyoxylate correspond à une intervention au niveau des systèmes de transport des dicarboxylates. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III. Chaque valeur de la concentration est la moyenne d'une dizaine de mesures. Le test F de Snédécor indique que les variances des populations témoins et glyoxylate sont comparables. On exécute alors un test t de Student afin de comparer les moyennes. Lorsqu'il est utilisé en état 3 à la concentration de 2 mM, le glyoxylate diminue la vitesse respiratoire de 20 à 30 p. cent. On observe parallèlement une inhibition de la pénétration de 30 à 40 p. cent. Ces différences sont hautement significatives.

Tableau III.

Effets du glyoxylate 2mM sur la pénétration intramitochondriale et l'oxydation du succinate 0,8 mM.

Expériences	Molarité intramatricielle du succinate		Inhibition de la respiration p. cent	Inhibition de la pénétration p. cent
	Témoin	Glyoxylate		
1	1,71 ± 0,34	1,01 ± 0,30	28	40
2	1,78 ± 0,11	1,23 ± 0,08	18	30
3	2,40 ± 0,17	1,66 ± 0,34	19	30

Les résultats sont données avec un intervalle de confiance de 95 p. cent.
Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte.

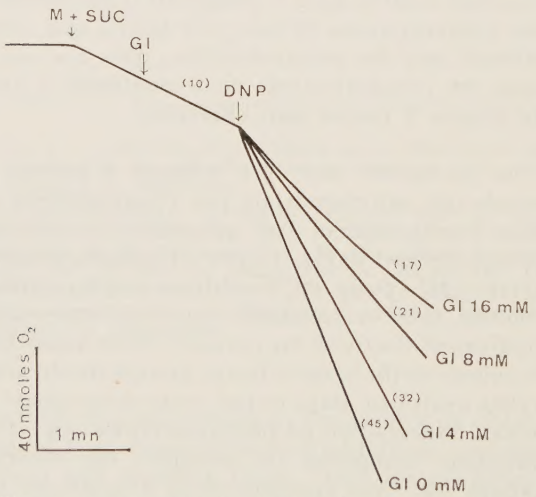

Fig. 5. — *Influence du glyoxylate sur la respiration des mitochondries placées en état découplé dans un milieu dépourvu de phosphate.*

Les mitochondries (M = 2,1 mg de protéines dans 1,5 ml) sont en suspension à 25°C dans un tampon pH 7,4 dont la composition est : NaF 12 mM, $MgCl_2$ 6 mM, NaCl 26 mM, Tris-KCl 14,5 mM ; il contient de la roténone 1,5 µM et du succinate (SUC) 6 mM. Le glyoxylate (Gl) est ajouté en état 4, une minute avant le 2,4-dinitrophénol (DNP) 50 µM.

Les chiffres entre parenthèses indiquent les vitesses respiratoires exprimées en nmoles d'O_2 × mn^{-1} × mg^{-1}.

3. *Etat découplé sans phosphate.*

Lors des essais précédents les particules se trouvent dans les conditions de l'état 3, c'est-à-dire en présence de phosphate ; or Klingenberg a

Tableau IV.

Effet protecteur du phosphate sur l'inhibition respiratoire du glyoxylate en état 3.

Vitesse respiratoire en nmoles O_2 × mn^{-1} × mg^{-1}.

	Glyoxylate	0 mM	4 mM	8 mM	16 mM
phosphate avant (1)	30 sec	31,8	14,4	8,7	8,7
	1 mn	31,8	10,2	7,2	4,5
	2 mn	31,8	9,0	5,4	4,5
phosphate après (2)	30 sec	31,2	9,0	6,0	4,8
	1 mn	31,2	9,0	5,7	4,8
	2 mn	31,2	9,0	5,7	4,8

Les mitochondries (2,1 mg de protéines dans 1,5 ml) sont en suspension à 25°C dans un tampon Tris-KCl pH 7,4 (voir figure 5) contenant de la roténone 1,5 µM et du succinate 6 mM. Le phosphate de potassium 1,6 mM est ajouté, soit au début de l'incubation lors des essais [1] soit en même temps que l'ADP lors des essais [2]. Le glyoxylate est ajouté en état 4 une minute avant l'ADP 0,5 mM.

Les vitesses respiratoires sont mesurées 30 secondes, 1 minute ou 2 minutes après addition de l'ADP.

montré que les activités des divers transporteurs sont liées ; en particulier le passage des dicarboxylates nécessite du phosphate [30]. La diminution de la concentration intramitochondriale de succinate provoquée par le glyoxylate peut donc soit être la conséquence d'une intervention directe sur le transporteur des dicarboxylates soit résulter de l'inhibition du transport du phosphate. En nous plaçant dans un milieu dépourvu de phosphate, les mitochondries étant en état découplé, nous éliminons l'influence du transport de phosphate. Les résultats obtenus dans ces conditions sont présentés sur la figure 5. L'addition de glyoxylate provoque une inhibition croissant avec sa concentration. On est donc amené à envisager une intervention de l'effecteur au niveau du transport des dicarboxylates ou/et du transport des électrons, puisque seules ces deux étapes interviennent.

C. — Protection des fonctions mitochondriales par le phosphate.

Debise et Durand ont montré que le phosphate exerce une protection vis-à-vis de l'inhibition du transport de phosphate par un réactif alkylant tel que la N-éthylmaléimide (NEM) [26].

Nous avons recherché un effet similaire du phosphate sur l'action respiratoire du glyoxylate. Nous avons vu précédemment que l'inhibition de la consommation d'oxygène en état 3 produite par le glyoxylate s'établit progressivement. Les résultats présentés sur le tableau IV montrent que, lorsque l'effecteur est ajouté avant le phosphate, l'effet est plus rapide. On peut en conclure que la présence du phosphate protège les fonctions mitochondriales en retardant l'action du glyoxylate.

CONCLUSION.

Le glyoxylate, acide aldéhydique, inhibe la respiration des mitochondries en présence de divers substrats et dans des états énergétiques variés : état 3, état activé par un cation et état découplé. Nos résultats sur le gonflement mitochondrial montrent qu'il inhibe le transporteur de phosphate. Plusieurs faits expérimentaux peuvent s'interpréter par ce seul mécanisme :

— l'inhibition de la respiration en état 3 peut s'expliquer par une telle action puisque la synthèse d'ATP nécessite du phosphate.

— il n'y a pas d'action sur la consommation d'oxygène en état 4.

— on peut rendre compte aussi de la diminution de la respiration activée par un cation car l'intensité de la stimulation dépend de la présence de phosphate [33].

— l'inhibition de l'accumulation du succinate pourrait être la conséquence de l'inhibition du transport puisque Klingenberg a montré que les activités des différents transporteurs sont liées, en particulier celui des dicarboxylates est influencé par le phosphate [30].

— l'inhibition observée en état découplé pourrait provenir de la diminution de la concentration intramitochondriale du substrat.

Cependant l'intervention du glyoxylate au niveau du transporteur de phosphate ne permet pas d'expliquer, d'une part, que la respiration inhibée en état 3 puisse devenir inférieure à celle de l'état 4, d'autre part, qu'une inhibition soit observée dans un milieu découplé sans phosphate. Dans ce dernier cas, l'effecteur interviendrait directement sur le transport du substrat ou/et celui des électrons. Une intervention au niveau du transfert des électrons est étayée par deux faits : l'étude des états d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires par Di Jeso a montré un point d'intervention de l'effecteur soit dans la région des flavoprotéines, soit dans une région proche du second site de phosphorylation [6], on observe également une inhibition de l'état découplé en présence de β-hydroxybutyrate, or aucun transporteur spécifique de cet anion n'a été caractérisé dans la membrane interne mitochondriale [30].

Les résultats obtenus avec le dithiothréitol sur la respiration et l'activité du transporteur de phosphate montrent que le glyoxylate est un agent capable de bloquer certains SH. L'accessibilité de ces groupements peut être modifiée par des agents tels que ADP, phosphate, découplants [7, 20]. L'addition d'ADP induirait des modifications conformationnelles de la membrane interne qui augmenteraient le nombre de groupements SH accessibles aux inhibiteurs. Certains seraient démasqués même en l'absence de production d'énergie par suite de la liaison de l'ADP à sa translocase [21, 34], d'autres le seraient lors de la transition état 4/état 3, en relation avec le couplage [8, 35]. L'addition de glyoxylate ne modifie pas la respiration des mitochondries en état 4 mais nos essais montrent que si l'on ajoute ensuite de l'ADP, on observe une stimulation transitoire de la respiration suivie d'une inhibition. Cette activation peut refléter une modification conformationnelle qui démasque des thiols avec lesquels le glyoxylate peut alors réagir. Lorsque le temps d'incubation avec l'effecteur croît, l'intensité et la durée de la stimulation diminuent. On peut penser

que le glyoxylate bloquerait certains groupements SH même en l'absence d'ADP mais beaucoup moins rapidement que lorsque ceux-ci sont rendus accessibles par la modification conformationnelle de la membrane interne. Bien que le glyoxylate ne produise aucune modification en état 4, la respiration inhibée en état 3 devient inférieure à celle de l'état 4. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'addition du nucléotide rend accessible à l'effecteur certains -SH de la chaîne respiratoire, ceux-ci étant « enterrés » en absence d'accepteurs de phosphate.

Les découplants diminuent le nombre de -SH titrables par le DTNB (acide 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoïque) [20] ; un plus grand nombre de -SH est donc accessible aux agents alkylants en état 3 qu'en état découplé. On constate parallèlement un effet inhibiteur respiratoire du glyoxylate plus intense en état 3.

Debise et Durand [26] suggèrent que des fonctions thiols du transporteur de phosphate pourraient être mobiles, le phosphate provoquant une orientation des -SH du côté de la matrice mitochondriale les rendant ainsi moins accessibles aux agents alkylants. Ceci est en accord avec nos résultats montrant que l'inhibition en état 3 s'établit plus rapidement dans un milieu dépourvu de phosphate.

Enfin selon Tyler [36] et la théorie chimiosmotique [37], le transporteur de phosphate ferait partie du mécanisme de couplage. Gautheron rapporte de nombreuses données expérimentales en accord avec cette hypothèse [8]. Nos résultats montrant que le glyoxylate intervient au niveau du couplage et inhibe le transport du phosphate s'inscrivent en faveur de ce modèle.

Résumé.

Le glyoxylate est un effecteur des oxydophosphorylations des mitochondries isolées, puisqu'il freine la respiration en état 3 mais ne modifie pas celle de l'état 4. Notre travail a consisté à rechercher le mécanisme d'action de ce produit. Il ressort de nos essais que :

— l'inhibition respiratoire en état 3 n'est pas immédiate. Elle peut être partiellement levée par addition d'un découplant ou d'un dithiol. Elle se manifeste également avec des substrats faisant intervenir d'autres systèmes de transport membranaires.

— le glyoxylate freine aussi la consommation d'oxygène stimulée par le 2,4-dinitrophénol et le strontium.

— il inhibe le transport du phosphate et cette action peut rendre compte de la plupart des effets observés.

— on constate une diminution de l'accumulation intramitochondriale du succinate parallèlement à l'inhibition respiratoire de l'état 3. Cette diminution pourrait résulter d'une intervention directe de l'effecteur sur le transporteur des dicarboxylates ou n'être que la conséquence de l'inhibition du transport de phosphate, les activités de ces divers systèmes étant liées.

— la diminution de la vitesse respiratoire des mitochondries placées en état découplé dans un milieu dépourvu de phosphate traduit une intervention directe de l'effecteur au niveau du transport de substrat ou/et du transfert des électrons.

— enfin on observe un effet protecteur des fonctions mitochondriales par le phosphate puisque celui-ci retarde l'inhibition respiratoire due au glyoxylate.

Le glyoxylate possède donc plusieurs sites d'intervention dans les mitochondries. Il agirait en bloquant des groupements SH avec lesquels il forme des hémimercaptals. Ses effets s'expliqueraient par une accessibilité variable de ces groupements sous l'influence d'agents tels que ADP, Pi, découplants... qui provoquent des modifications conformationnelles de la membrane interne.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Saz, H. J. & Hillary, E. P. (1956) *Biochem. J.*, **62**, 562-569.
2. Nordmann, J. & Nordmann, R. (1961) *Adv. Clinical Chem.*, **4**, 53.
3. Adinolfi, A., Ollezza, S. & Ruffo, A. (1967) *Biochem. J.*, **104**, 50p-51p.
4. Ruffo, A., Malcovati, M. & Adinolfi, A. (1966) *Regulation of metabolic processes in mitochondria*, B.B.A. Library, **7**, 518-524.
5. Ruffo, A. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 461-476.
6. Di Jeso, F., Michel, R., Michel, O. & Ruffo, A. (1970) *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **164**, 506-511.
7. Gautheron, D. C. (1970) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **52**, 499-521.
8. Gautheron, D. C. (1973) *Biochimie*, **55**, 727-747.
9. Gautheron, D. C. & Pialoux, N. (1966) *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **262**, 186-189.
10. Fluharty, A. & Sanadi, D. R. (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **46**, 608-611.
11. Chappel, J. B. & Haaroff, K. N. (1966) *Biochemistry of mitochondria* Acad. Press., 75-91.
12. Robinson, B. H. & Chappell, J. B. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 249-255.
13. Lardy, H. A. & Ferguson, S. M. (1969) *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 991-1034.
14. Van Den Berg (1967) *Mitochondria structure and compartimentation*, Adriatica Ed., 203-206.
15. Chappell, J. B. (1969) *Inhibitors : tools in cell research*, Ed. Bucher, T. & Sies, H., 335-350.
16. Meijer, A. J. & Tager, J. M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 136-139.
17. Meijer, A. J., Lofrumlnto, N. E., Papa, S., Tager, J. M. & Quagliariello, E. (1970) *Biochem. J.*, **116**, 35p-36p.
18. Quagliariello, E. & Palmieri, F. (1968) *European J. Biochem.*, **4**, 20-27.
19. Harris, E. J. & Manger, J. R. (1968) *Biochem. J.*, **109**, 239-246.
20. Gautheron, D. C., Sabadie-Pialoux, N., Goldschmidt, D., Morelis, R., Foucher, B. & Gaudemer, Y. (1971) *Energy transduction in respiration and photosynthesis*, Eds. Quagliariello, E., Papa, S. & Rossi, C. S., Adriatica Ed., 807-816.
21. Leblanc, P. & Clauser, H. (1972) *FEBS Letters*, **23**, 107-113.
22. Schneider, W. C. & Hogeboom, H. C. (1950) *J. Biol. Chem.*, **183**, 123-128.
23. Roche, J., Rall, J. E., Michel, R., Michel, O. & Varronne, S. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 188-190.
24. Gornall, A. J., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949) *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.

25. Chappell, J. B. & Crofts, A. R. (1966) *Regulation of metabolic processes in mitochondria*, B. B. A. Library, **7**, 293-314.
26. Debise, R. & Durand, R. (1974) *Biochimie*, **56**, 161-170.
27. Werkeiser, W. C. & Bartley, W. (1957) *Biochem. J.*, **66**, 79-91.
28. Harris, E. J., Van Dam, K. & Pressman, B. C. (1967) *Nature*, **213**, 1126-1127.
29. Palmieri, F. & Quagliariello, E. (1969) *European J. Biochem.*, **8**, 473-481.
30. Klingenberg, M. (1970) *FEBS Letters*, **6**, 145-154.
31. Meijer, A. J., Groot, G. S. P. & Tager, J. M. (1970) *FEBS Letters*, **8**, 41-44.
32. Robinson, B. H. & Chappell, J. B. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 249-255.
33. Chance, B. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 27-29.
34. Vignais, P. V. & Vignais, P. M. (1972) *FEBS Letters*, **26**, 27-31.
35. Gautheron, D. C. & Sabadie-Pialoux, N. (1969) Warwick meeting of the Biochemical Society, The *Biochemical Society Agenda Papers*, Abstract N° 1, 9p.
36. Tyler, D. D. (1969) *Biochem. J.*, **111**, 665-678.
37. Mitchell, P. (1961) *Nature*, **191**, 144-148.